



CT 100 126 50
0/35437
Mod. C.E. - 1-4-7

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

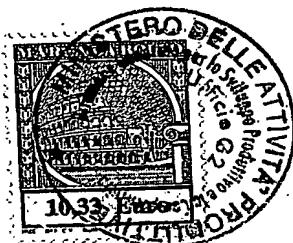
REC'D 04 FEB 2004

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale

N. RM2002 A 000576



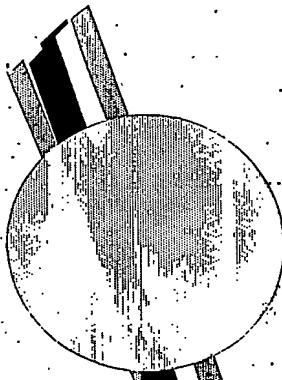
Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

12 GEN. 2004

Roma, II



per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano

BEST AVAILABLE COPY

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

A. RICHIENDENTE (I)

REG. A

DATA DI DEPOS

DATA DI DEPOSITO

RM 2002 A 000576

Denominazione

Residenza

FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR

Via Olgettina n. 60 - 20132 MILANO - IT

D. TITOLO MEZZI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI PER PATOLOGIE CORRELATE ALL'EMICRANIA.

Classe proposta (sez./cl./scl/)

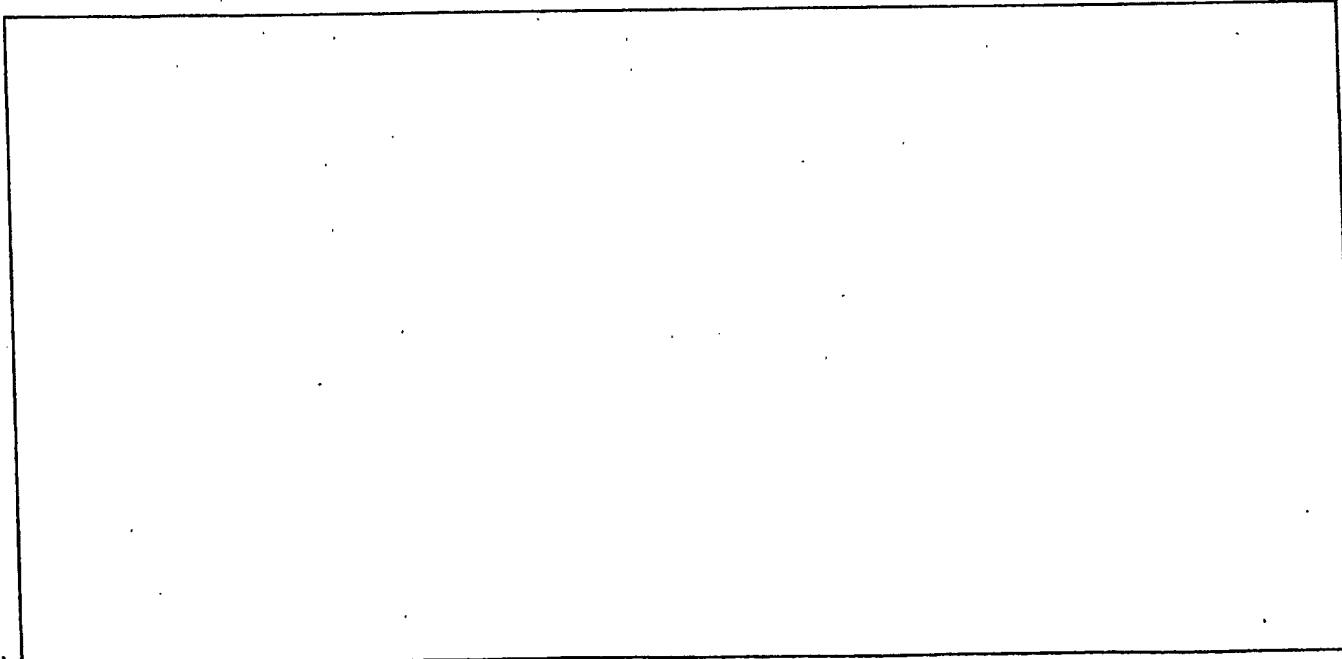
(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritto un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene codificante per una porzione funzionale della subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) per uso diagnostico o terapeutico di patologie correlate all'emicrania. Sono descritti anche opportuni kit diagnostici e metodi per l'identificazione di agenti agonisti o antagonisti.



M. DISEGNO



2 RM 2002 A 000576

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:

“Mezzi diagnostici e terapeutici per patologie correlate all'emicrania”

a nome: FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE

TABOR

Inventori: Casari Giorgio, De Fusco Maurizio, Marconi Roberto

La presente invenzione concerne mezzi diagnostici e terapeutici per patologie correlate all'emicrania.

L'emicrania è caratterizzata da attacchi di mal di testa, talvolta è associata a disfunzioni autonomiche e da sintomi neurologici di breve durata (aura). La patologia riguarda circa il 12% della popolazione mentre il 20% dei pazienti con emicrania mostra sintomi di aura^{1 2 3 4 5}. Benché il modo di trasmissione sia controverso⁶, l'emicrania mostra una forte aggregazione familiare⁷. Alcuni studi di popolazione e studi su gemelli indicano che fattori genetici sono implicati, prevalentemente nell'emicrania con aura^{8 9}. L'emicrania familiare emiplegica (FHM) è una patologia neurologica invalidante con aura ed emiparesi, riguarda circa il 1/10000-1/50000 della popolazione si trasmette come un carattere autosomico dominante¹⁰.

E' stato precedentemente identificato un gene associato a FHM1(MIM 141500), codificante per una proteina del canale neuronale del calcio, (CACNA1A)¹¹.

La domanda di brevetto PCT WO98/55647 descrive un metodo di diagnosi genotipica indiretta per la emicrania emiplegica di tipo 2 che

riguarda un'ampia regione di 21 cM (centimorgan) del cromosoma 1q21-23. La descrizione non identifica alcun gene correlato alla patologia, ma ne suggerisce due come candidati, GIRK3 (codificante per una proteina del canale del potassio) e CACNL1A6 (codificante per una proteina del canale del calcio).

Gli autori della presente invenzione hanno identificato il gene associato a FHM2 (MIM 602481), che mappa sul cromosoma 1q23¹², dimostrando come mutazioni nella subunità alfa 2 della pompa Na K ATPasi (ATP1A2) siano responsabili di tale patologia. Il gene identificato non corrisponde a nessuno dei geni o regioni suggerite dai documenti di tecnica anteriore, in particolare dalla domanda di brevetto PCT WO98/55647. Gli autori hanno dimostrato che le mutazioni missenso identificate causano una perdita di funzione del principale sistema di trasporto ionico. Questo ha rilevanti implicazioni per l'origine della depressione corticale diffusa dell'attività neuronale e lo sviluppo dell'emicrania. E' la prima dimostrazione che mutazioni nella pompa Na K sono associate a malattie genetiche. E' inoltre da sottolineare come un'indagine effettuata sui geni GIRK3 e CACNL1A6 non ha evidenziato alcuna mutazione in essi correlata alla patologia emicranica.

Inoltre è possibile studiare polimorfismi associati a tale gene per correlarli come fattori predisponenti all'emicrania comune.

Forma pertanto oggetto della presente un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene codificante per una porzione funzionale o della regione di regolazione genica della subunità

alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) per uso diagnostico di patologie correlate all'emicrania.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene codificante per una porzione funzionale o della regione della regolazione genica della subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) per uso in terapia genica di patologie correlate all'emicrania.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, localizzato sul cromosoma 1, correlato a patologie emicraniche, comprendente le fasi di: - prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura; - isolare il DNA dal campione; - sottoporre il DNA ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di oligonucleotidi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o un frammento della regione di regolazione di esso; - evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale. Preferibilmente le coppie di oligonucleotidi sono:

17 AGTCCCTCTGACCTCCCTGAT CCACTGTGCCATCACGATT

19 CTTCTGCTTCCTGCTCTGACC ACACATGTGCGCTGTGTTAC

In una forma di attuazione del metodo dell'invenzione la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie

di oligonucleotidi in grado di amplificare tutta la porzione codificante del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana. Preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare tutta la porzione codificante del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana comprende l'uso di almeno una delle seguenti coppie di oligonucleotidi:

1	TGTTGCTTGGCTTCTCTGT	CTCCCTCACCCCTCTAGACTGC
2+3	CCCCTCTCTTCCCTGACTCT	GCCTCTTTGTTCCCTCCCTA
4	ATGGTGACTGGCTGGGTTG	CAGGGTTGGAGGGACAGTCAC
5	AGCTGCCCTTAGGGTTG	ACCTTACAGCCTAGCCCAGAG
6	GAGACCAGCAGGAGAAGAAGG	AGACTCAACTGCTTGCTCTGG
7	TACAAGTGGCTCTGCCAGTCT	AGCCCTTCATCCTGACTATGG
8	CAGGAAATAGGATGGGACTGC	GTAGTGAGACCCCTCCCTGGT
9	ATCTCCGGCTTCAGCCTTAAC	TAATCCTATCCACCCCTCTG
10+11	CTCCTGGTCCCCCTCAT	TCCCTCTCTTCCCTGTCC
12	GCGCTACCAAGACAAGTATGG	CTTGGGAATCCCTCTGAG
13	GAAGCCACTCTGCGGATCT	ACTGCAGCTCCTGAACTCTG
14	GGAGGGGGATAAACCTTAAT	GACGTGTTGATTAGGGCACAG
15	AGGGTCAGCTGTCTGTGTC	GGTCCCTGCCTGTCATCTG
16	AAGGGTTTCGTCCTCAAGT	TCAGTATCCTGCAAACCATCC
17	AGTCCCTCTGACCTCCCTGAT	CCACTGTGCCATCACGATT
18	TCATCTCCTACGTCCCTCAA	AGCTGGAAAAGAACCCGT
19	CTTCTGCTTCCTGCTCTGACC	ACACATGTGCGCTGTGTTAC
20	CCTCCGACACTCTCATCTGTC	CTGTGTGGTTGGTGAGTGT
21	CTTCACCTGCCACCTCCTT	CCCCCGTATGACTACTCAGG



22	CGCTTTGAATGCTCCTTATG	GAGGGAGGAGCTGGTGGT
23	GCCTCCTTTAACGCTCATGCT	GCCTCATTATCTCTCCCCAAA

In una forma di attuazione del metodo dell'invenzione la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di oligonucleotidi in grado di amplificare la regione di regolazione del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana. Preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare la regione di regolazione del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana comprende l'uso delle coppie di oligonucleotidi:

1_Pr	TTCCCCCTCACTCCATCTCTG	GACCCCTGCTCTTAGGGATA
2_Pr	GATTCAAGGACCACTCCATCC	GGGAACAGTCAGAGGACAGG

In una forma preferita del metodo dell'invenzione la fase di evidenziazione di almeno un frammento amplificato con eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta o per metodica SSCP (single strand conformation polymorphism¹⁷) DHPLC, o DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis¹⁸), o con altri metodi noti all'esperto del settore.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un kit diagnostico per patologie collegate all'emicrania comprendente: - almeno una coppia di oligonucleotidi per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, in cui il frammento codifica per una porzione funzionale o di regolazione genica della subunità; - un DNA di controllo da soggetto non affetto. In una forma preferita le coppie di

oligonucleotidi per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare tutta la regione codificante del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione la proteina subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di patologie collegate all'emicrania.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione la proteina subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di patologie collegate all'emicrania.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo per l'identificazione di un agente agonista o antagonista della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana o di una porzione funzionale o di regolazione genica di essa, comprendente:

- (i) transfettare una linea cellulare con un gene per una isoforma mutante della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana che sia resistente all'ouabaina;
- (ii) esporre opportunamente le cellule trasfettate all'agente;
- (iii) misurare l'attività della pompa Na K in funzione del trasporto ionico con ioni marcati.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo per l'identificazione di un agente agonista o antagonista della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) o di una porzione funzionale comprendente le fasi di:

- (i) trattare con l'agente un animale transgenico che esprima un'isoforma mutante della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) o che sia

deleto in parte o completamente del gene codificante la pompa Na K (ATPasi, ATP1A2), o

(ii) trattare con l'agente linee cellulari eucariotiche o procariotiche che esprimano forme mutanti o normali della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) mediante transfezioni transienti o stabili oppure in condizioni fisiologiche.

L'invenzione verrà ora descritta in riferimento a esempi non limitativi, con le seguenti figure:

Figura 1 Mutazioni di ATP1A2. Pannello a, Pattern di eluizione in D-HPLC dell'esone 17 (sinistra) e 19 (destra) dell'allele normale (blu) e mutante (rosso). Panello b mostra elettroferogrammi di sequenza del controllo (parte superiore) e mutanti eterozigoti (parte inferiore). Pannello c, pedigree delle due famiglie FHM2.

Figura 2 Allineamento della sequenza amminoacidica delle ATPasi. Si nota la completa conservazione di L764 (sinistra) e W887 (destra) in diverse subunità delle ATPasi Na K e H K. Il numero di accesso alla SwissProt è indicato.

Figura 3 Topologia della proteina ATP1A2. Il sito di legame all'ouabaina sul primo loop (M1-M2; gli asterischi indicano gli amminoacidi mutagenizzati per conferire resistenza all'ouabaina) e le due mutazioni, una sul loop intracellulare più grande (M4-M5) e la seconda sul loop extracellulare (M7-M8), sono indicati.

Figura 4 Trattamento con ouabaina di cellule HeLa trasfettate. Foto al contrasto di fase di cellule HeLa, dopo 36 hr di trattamento con 1 μ M di ouabaina, trasfettate con: pannello a, controllo (trasfettate con

un costrutto esprimente il gene wild-type ATP1A2 sensibile alla ouabaina); pannello *b*, gene wild-type ATP1A2 resistente all'ouabaina, pA2Oua®-wt; pannelli *d* e *f*, mutanti di ATP1A2 ouabaina resistenti, pA2Oua®-P764 e pA2Oua®-R887, rispettivamente; pannello *c*, miscela 1:1 mix di pA2Oua®-wt + pA2Oua®-P764, per simulare lo stato di eterozigoti in L764P; pannello *e*, miscela 1:1 di pA2Oua®-wt + pA2Oua®-R887, per simulare lo stato di eterozigoti di W887R. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati co-trasfettando il costrutto ATP1B2.

Figura 5 Tossicità della ouabaina sulla vitalità cellulare.

Pannello *a*, vitalità cellulare per saggio MTT di cellule HeLa trasfettate con diversi costrutti riportati in Figura 4: controllo; A2-wt (pA2Oua®-wt); mu-1 (pA2Oua®-P764); het-1 (pA2Oua®-wt + pA2Oua®-P764); mu-2 (pA2Oua®-R887); het-2 (pA2Oua®-wt + pA2Oua®-R887). Entrambi i mutanti e gli eterozigoti simulati sono significativamente diversi dal wt A2 (almeno $P < 0.04$). Le linee rappresentano la SD. Pannello *b*, trascrizione e traduzione *in vitro* che conferma l'attesa massa molecolare della proteina ATP1A2 di 112 kDa.

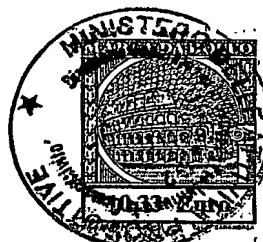


Figura 6 Localizzazione dei mutanti ATP1A2 sulla membrana plasmatica. Pannello *a*, immunocitochimica su cellule COS-7 dei derivati di *c-myc*, pA2Oua®-wt-*myc*, pA2Oua®-P764-*myc* e pA2Oua®-R887-*myc*, che mostrano la localizzazione sulla membrana plasmatica sia del wild type e delle isoforme mutanti. Pannello *b*, frazionamento subcellulare di cellule COS-7 trasfettate che dimostra la co-sedimentazione della membrana plasmatica con derivati ATP1A2 *c-myc*; s/n, supernatante; p, pellet.

Materiali e Metodi

Famiglie FHM2

Sono stati selezionati 22 soggetti di un grande pedigree proveniente dalla Toscana (famiglia 1), con una diagnosi clinica di FHM⁵ e 7 membri di un secondo pedigree, con manifestazioni simili, proveniente dalla Sicilia (famiglia 2). Non vi era alcun segno cerebellare associato con la FHM. L'inizio degli attacchi era sempre entro i venti anni. Caratteristiche aggiuntive erano: epilessia in 5 membri (3 soggetti della famiglia 1 e 2 della famiglia 2) e ritardo mentale lieve o moderato in 2 soggetti della famiglia 1. 200 individui sani sono stati utilizzati come controllo.

Analisi di mutazioni.

L'organizzazione genomica del gene umano *ATP1A2* è stata determinata allineando la sequenza del mRNA *ATP1A2* (AC NM_000702) con la sequenza genomica del clone RP11-536C5 corrispondente. Gli oligonucleotidi per l'amplificazione delle regioni codificanti del gene sono riportati in tabella 1. I prodotti di PCR che mostravano pattern di eluizione in D-HPLC anormali (Wave, Transgenomic, Crewe, UK) erano sottoposti a sequenza diretta (DYEnamic ET Dye Terminator Kit, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

Tabella 1

Esone	Innesco diretto	Innesco inverso	bp
1	TGTTGCTTGGCTTCTCTGT	CTCCCTCACCCCTCTAGACTGC	177
2+3	CCCCTCTCTCCCTGACTCT	GCCTCTTTGTTCCCTCCCTA	423

4	ATGGTGACTGGCTGGTTG	CAGGGTTGGAGGACAGTCAC 316
5	AGCTGCCCTTAGGGTTG	ACCTTACAGCCTAGCCCAGAG 213
6	GAGACCAGCAGGAGAAGAAGG	AGACTCAACTGCTTGCTCTGG 238
7	TACAAGTGGCTTGCCAGTCT	AGCCCTTCATCCTGACTATGG 234
8	CAGGAAATAGGATGGGACTGC	GTAATGAGACCCCTCCCCTGGT 385
9	ATCTCCGGCTTCAGCCTTAAC	TAATCCTATCCACCCCCCTTG 283
10+11	CTCCTGGTTCCCCCTCAT	TCCCTCTCTTCCCTGTCC 487
12	GCGCTACCAAGACAAGTATGG	CTTGGGAATCCCCTTGAG 284
13	GAAGCCACTCTGCGGATCT	ACTGCAGCTCCTGAACCTTG 286
14	GGAGGGGGATAAACCTTAAT	GACGTGTTGATTAGGGCACAG 236
15	AGGGGTCAGCTGTCTGTGTC	GGTCCCTGCCTGTCACTTG 284
16	AAGGGGTTTCGTCCCTCAAGT	TCAGTATCCTGCAAACCATCC 284
17*	AGTCCCTCTGACCTCCCTGAT	CCACTGTGCCATCACGATT 252
18	TCATCTCCTACGTCCCTCAA	AGCTGGAAAAGAACCCCTGT 234
19*	CTTCTGCTTCCTGCTCTGACC	ACACATGTGCGCTGTGTTAC 232
20	CCTCCGACACTCTCATCTGTC	CTGTGTGGTTGGTGAGTGT 236
21	CTTCACCTGCCACCTCCTT	CCCCCGTATGACTACTCAGG 176
22	CGCTTGAATGCTCCTTATG	GAGGGAGGGAGCTGGTGGT 223
23	GCCTCCTTTAAGCTCATGCT	GCCTCATTATCTCTCCCCAAA 206

Le coppie di primers 17 e 19 (*) sono state utilizzate per identificare le due mutazioni associate a FHM2. Le PCR sono state effettuate ad una temperatura di 57°C.

Gli oligonucleotidi che permettono l'amplificazione delle regioni regolatrici dell'espressione genica (circa 3 kb, suddivise in due frammenti con parziale sovrapposizione) sono elencati in Tabella 2.

Tabella 2

1_Pr	TTCCCCTCACTCCATCTCTG	GACCCCTGCTCTTAGGGATA
2_Pr	GATTCAAGGACCCTCCATCC	GGGAACAGTCAGAGGACAGG

L'analisi del DNA amplificato è stata effettuata per sequenza diretta e mediante DHPLC (denaturing high-pressure chromatography¹⁶).

Costrutti e mutagenesi sito-specifica

Il cDNA codificante per la subunità beta 2 (ATP1B2, NM_001678) e alfa 2 erano ottenuti dal clone IMAGE 23453 e DFKZp761D047, rispettivamente, e successivamente subclonati nel vettore di espressione pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). E' stato utilizzato il kit QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, USA) per mutagenizzare il cDNA di ATP1A2 come segue:

- nt 451 A>G (Q116R) e nt 483 A>G (N127D) per ottenere il costrutto pA2Oua®-wt esprimente l'isoforma resistente all'ouabaina;
- nt 2395 T>C (L764P) su pA2Oua®-wt, ottenendo pA2Oua®-P764;
- nt 2763 T>C (W887R) su pA2Oua®-wt, ottenendo pA2Oua®-R887.
- c-myc-tagging il cDNA ATP1A2. I costrutti di espressione (pA2Oua®-wt, pA2Oua®-P764, e pA2Oua®-R887) erano mutagenizzati sostituendo il codone di inizio originale con c-myc tag (consistente degli aa MAEEQKLISEEDL, corrispondenti agli aa 408-419 c-myc umano AC 0907235A) ottenendo pA2Oua®-wt-myc, pA2Oua®-P764-myc e pA2Oua®-R887-myc. Tutti i costrutti erano verificati per sequenziamento.

Trascrizione e traduzione in vitro

La trascrizione e traduzione *in vitro* usando TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI, USA) in presenza di 20 microCi [35S]metionina (1000 Ci/mmole); le proteine neosintetizzate per SDS/PAGE (8%).

Analisi per elettroforesi e western blot

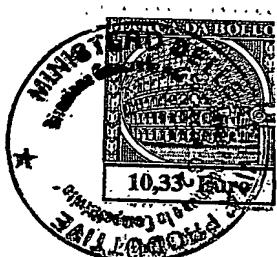
Si risospendevano quantità uguali di proteine in tampone SDS-PAGE (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerolo, 5% 2-mercaptopetanolo) e si separavano per 2 h a 100V in 10% SDS-gel di poliacrilammide. Le proteine su gel erano trasferite su membrane di nitrocellulosa e si incubavano con gli anticorpi monoclonali primari anti-c-myc 9E10 (10 microg/ml) o con anticorpi polyclonali anti-Integrina beta 1 seguita da incubazione con anticorpi secondari coniugati a perossidasi da rafano (HRP). Le bande proteiche erano visualizzate con il kit Enhanced Chemiluminescence (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Trasfezioni e trattamento con ouabaina.

I costrutti erano trasfettati con fosfato di calcio in cellule HeLa, secondo le procedure standard o in cellule COS-7 con Lipofectamina (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA).

La vitalità cellulare era misurata con il saggio di riduzione con MTT ¹³ dopo 12, 24, 36, 48 e 60 ore. Ciascun esperimento era fatto in triplicato e l'analisi statistica effettuata con il Test di Student, (omoscedastica).

Immunocitochimica



Dopo trasfezione (48 hr), le cellule COS-7 erano fissate in 100% metanolo e incubate con anticorpi monoclonali primari anti c-myc 9E10. Le cellule erano poi lavate con PBS e incubate con anticorpi secondari anti-topo coniugati con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Le cellule erano montate su vetrino in mezzo fluorescente (DAKO, Glostrup, Denmark) e visualizzate con ottica di epifluorescenza.

Frazionamento subcellulare

Le cellule COS-7 erano lisate in ghiaccio in 0.5 M NaCl, 10 mM Na₂CO₃, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Leupeptina, omogenizzate e centrifugate a 2.000 g per 20 min a 4°C per scartare i nuclei e detriti cellulari. La separazione della frazione di membrane (pellet) da quella citosolica (supernatante) era ottenuta per centrifugazione a 100.000 g per 40 min a 4°C in una ultracentrifuga Beckman TL 100.

Risultati

Analisi delle mutazioni

Sebbene la regione cruciale per FHM2 sia di 0.9 Mb tra D1S2635 e CASQ1-SNP, diversi geni sono presenti in questa regione ed espressi nel Sistema Nervoso Centrale (CNS). Gli autori hanno effettuato un'analisi mutazionale su due probandi di famiglie FHM2, sia per D-HPLC (HPLC denaturante) che per sequenziamento diretto, analizzando due geni del canale del potassio, KCNJ9 e KCNJ10 e il gene CASQ1 codificante per la calsequestrina, con risultati negativi.

Invece l'analisi per D-HPLC del gene *ATP1A2* codificante la subunità alfa 2 della pompa Na,K ATPasi produceva pattern di eluzione aberranti per gli esoni 17 e 19 nelle famiglie 1 e 2, rispettivamente (Fig. 1a). L'analisi di sequenza rivelava la presenza di due mutazioni puntiformi (nt 2395 da T a C e nt 2763 da T a C; Fig. 1b), che segregano con la malattia nelle rispettive famiglie (Fig. 1c) e che causano la sostituzione dell'amminocido leucina con prolina (L764P) nella famiglia 1 e triptofano con arginina (W887R) nella famiglia 2. Entrambe le mutazioni missenso erano assenti in 400 cromosomi di controllo. L764 e W887 sono completamente conservate tra le subunità alfa di diverse specie evolutivamente distanti tra loro (Fig. 2), suggerendo fortemente l'implicazione di *ATP1A2* nella patogenesi di FHM2.

La pompa Na, K ha una struttura eterodimerica formata da una grande subunità catalitica alfa e da una piccola subunità ancillare beta. Le subunità alfa attraversano la membrana plasmatica con 10 segmenti transmembrana (M1-M10¹⁴) e sono orientate con le estremità ammino- e carbossi-terminale rivolte nel citoplasma. Questa configurazione produce cinque loop extracellulari e quattro intracellulari. Le mutazioni L764P e W887R hanno diverse localizzazioni: L764P si trova nel loop intracellulare più grande tra M4 e M5, mentre W887R si localizza nel loop apicale M7-M8 (Fig. 3).

Evidenza funzionale del blocco del trasporto ionico

Per valutare le conseguenze funzionali delle due sostituzioni amminoacidiche, gli autori hanno effettuato vari esperimenti di

trasfezione. Sono stati clonati i cDNA umani della subunità alfa 2 e beta 2 (Materiali e Metodi). Poiché entrambe le subunità sono necessarie per assemblare l'etero-complesso attivo alfa-beta, tutti gli esperimenti di trasfezione sono stati effettuati co-trasfettando entrambi i costrutti alfa 2 e beta 2 con stechiometria uguale. Introducendo le isoforme mutate (i.e. esprimono i cDNA dei mutanti P764 e R887), non si sono ottenuti cambi significativi nella forma cellulare e nel tasso di crescita (dati non mostrati), pertanto abbiamo escluso un effetto primario dominante negativo.

Poiché tutte le cellule dei vertebrati presentano un'attività ATPasi Na,K, è stata inibita l'attività endogena della pompa Na, K nelle cellule HeLa per poter così saggiare la capacità di trasporto ionico delle forme esogene mutanti. A questo scopo una mutagenesi sito-specifica è stata effettuata per abolire la sensibilità naturale all'ouabaina del costrutto ATP1A2 mutagenizzando due aminoacidi (Q116 in R e N127 in D) situati nel primo loop extracellulare che è parte del sito di legame dell'ouabaina sull'ATPasi Na K¹⁵.

Cellule HeLa trasfettate con il costrutto ATP1A2 resistente all'ouabaina (pA2Oua®-wt) possono sopravvivere e crescere in terreni con 1 µM ouabaina (Fig. 4, pannello b), mentre cellule di controllo muoiono entro 36-48 ore (Fig. 4, pannello a). Risultati identici erano ottenuti con la linea cellulare umana HEK293.

Una volta saggiaiato positivamente per la resistenza all'ouabaina, il costrutto pA2Oua®-wt era mutagenizzato per introdurre le mutazioni trovate nelle famiglie di FHM2, L764P e W887R, ottenendo i costrutti

corrispondenti pA2Oua®-P764 e pA2Oua®-R887. Le cellule HeLa trasfettate con pA2Oua®-P764 o pA2Oua®-R887 non sopravvivevano al trattamento con 1 μ M ouabaina (Fig. 4, pannelli *d* e *f*), suggerendo che sia L764P che W887R sono mutazioni che provocano una perdita di funzione. Gli eterozigoti simulati ottenuti per co-trasfezione di uguali quantità di wild-type e mutanti, mostravano un fenotipo intermedio (Fig. 4, pannello *c* e *e*). Entrambe le isoforme mutanti ATP1A2 quindi mostravano una mortalità cellulare precoce tipica di cellule senza l'attività della pompa Na K (Fig. 5a). Per escludere la possibile produzione di proteine aberranti dovute alla mutagenesi sito specifica si sono saggiati i costrutti wt e mutanti per trascrizione e traduzione *in vitro*, nonchè per sequenziamento diretto. Come mostrato in Figura 5b, tutti e tre i costrutti davano l'attesa banda proteica di 112 kDa, escludendo così che un artefatto di clonazione sia responsabile della vulnerabilità delle cellule HeLa verso l'ouabaina quando trasfettate con i cDNA mutanti ATP1A2.

Le isoforme mutanti di ATP1A2 sono veicolate alla membrana plasmatica

E' stata investigata la localizzazione subcellulare delle due isoforme mutanti. I tre costrutti (pA2Oua®-wt, pA2Oua®-P764, e pA2Oua®-R887) sono stati ingegnerizzati aggiungendo un 5' tag codificante per l'epitopo di *c-myc* e trasfettate in cellule COS-7. La Figura 6a mostra l'attesa localizzazione per immunofluorescenza sulla membrana plasmatica di tutte le isoforme, sia wild type che dei due mutanti. Il frazionamento subcellulare ha confermato la localizzazione fisiologica



nella frazione di membrana (Fig. 6b), dove è evidenziata la subunità beta 1 dell'integrina come controllo.

I dati dimostrano quindi che entrambe le mutazioni missenso sono indipendentemente sufficienti a inibire l'attività della pompa Na, K, senza interferire nell'assemblaggio con la subunità beta e con la traslocazione del complesso alla membrana cellulare.

Bibliografia

1. Stewart, W.F., Lipton, R.B., Celentano, D.D. & Reed, M.L. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *Jama* **267**, 64-9. (1992).
2. Lipton, R.B., Stewart, W.F., Diamond, S., Diamond, M.L. & Reed, M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* **41**, 646-57. (2001).
3. Rasmussen, B.K. & Olesen, J. Symptomatic and nonsymptomatic headaches in a general population. *Neurology* **42**, 1225-31. (1992).
4. Henry, P. et al. A nationwide survey of migraine in France: prevalence and clinical features in adults. GRIM. *Cephalgia* **12**, 229-37; discussion 186. (1992).
5. IHS. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. Headache Classification Committee of the International Headache Society. *Cephalgia* **8**, 1-96. (1988).
6. Russell, M.B. & Olesen, J. The genetics of migraine without aura and migraine with aura. *Cephalgia* **13**, 245-8. (1993).

7. Russell, M.B. & Olesen, J. Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *BMJ* **311**, 541-4. (1995).
8. Ulrich, V., Gervil, M., Kyvik, K.O., Olesen, J. & Russell, M.B. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann Neurol* **45**, 242-6. (1999).
9. Russell, M.B., Ulrich, V., Gervil, M. & Olesen, J. Migraine without aura and migraine with aura are distinct disorders. A population-based twin survey. *Headache* **42**, 332-6. (2002).
10. Blau, J.N. & Whitty, C. Familial hemiplegic migraine. *Lancet* **2**, 1115-6 (1955).
11. Ophoff, R.A. et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**, 543-52. (1996).
12. Ducros, A. et al. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. *Ann Neurol* **42**, 885-90. (1997).
13. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. & Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**, 581-93. (1997).
14. Hu, Y.K. & Kaplan, J.H. Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-ATPase alpha-subunit. *J Biol Chem* **275**, 19185-91. (2000).
15. Price, E.M., Rice, D.A. & Lingrel, J.B. Structure-function studies of Na,K-ATPase. Site-directed mutagenesis of the border residues from

the H1-H2 extracellular domain of the alpha subunit. *J Biol Chem* **265**, 6638-41. (1990).

16. Underhill PA, Jin L, Lin AA et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* **7**, 996-1005 (1997).

17. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. **5**, 874-879 (1989).

18. Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**, 3131-3145 (1985).

degli copi 150
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(Nº d'iscr. 820 B)



RIVENDICAZIONI

1. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene codificante per una porzione funzionale o della regione di regolazione genica della subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) per uso diagnostico di patologie correlate all'emicrania.
2. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene codificante per una porzione funzionale o della regione della regolazione genica della subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) per uso in terapia genica di patologie correlate all'emicrania.
3. Metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, localizzato sul cromosoma 1, correlato a patologie emicraniche, comprendente le fasi di:
 - prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura;
 - isolare il DNA da detto campione;
 - sottoporre detto DNA ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di oligonucleotidi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o un frammento della regione di regolazione di esso;
 - evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale.
4. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui le coppie di oligonucleotidi sono:



17	AGTCCCTCTGACCTCCCTGAT	CCACTGTGCCATCACGATT
19	CTTCTGCTTCCTGCTCTGACC	ACACATGTGCCTGTGTTTAC

5. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di oligonucleotidi in grado di amplificare tutta la porzione codificante del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana.

6. Metodo secondo la rivendicazione 5 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare tutta la porzione codificante del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana comprende l'uso di almeno una delle seguenti coppie di oligonucleotidi:

1	TGTTGCTTTGGCTTCTCTGT	CTCCCTCACCCCTAGACTGC
2+3	CCCCTCTCTTCCCTGACTCT	GCCTCTTTGTTCCCTCCCTA
4	ATGGTGACTGGCTGGGTTG	CAGGGTTGGAGGACAGTCAC
5	AGCTGCCCTTTAGGGTTG	ACCTTACAGCCTAGCCCAGAG
6	GAGACCAGCAGGAGAAGAAGG	AGACTCAACTGCTTGCTCTGG
7	TACAAGTGGCTCTGCCAGTCT	AGCCCTTCATCCTGACTATGG
8	CAGGAAATAGGATGGGACTGC	GTAGTGAGACCCCTCCCTGGT
9	ATCTCCGGCTTCAGCCTTAAC	TAATCCTATCCACCCCTCTG
10+11	CTCCTGGTCCCCCTCAT	TCCCTCTCTTCCCTGTCC
12	GCGCTACCAAGACAAGTATGG	CTTGGGAATCCCTTCTGAG
13	GAAGCCACTCTGCGGATCT	ACTGCAGCTCCTGAACTCTG
14	GGAGGGGGATAAACCCCTTAAT	GACGTGTTGATTAGGGCACAG
15	AGGGGTCAGCTGTCTCTGTC	GGTCCCTGCCTGTCATCTG
16	AAGGGGTTTCGTCCCTCAAGT	TCAGTATCCTGCAAACCATCC

17	AGTCCCTCTGACCTCCCTGAT	CCACTGTGCCATCACGATT
18	TCATCTCCTACGTCCCTCAA	AGCTGGGAAAAGAACCTGT
19	CTTCTGCTTCCTGCTCTGACC	ACACATGTGCGCTGTGTTAC
20	CCTCCGACACTCTCATCTGTC	CTGTGTGGGTTGGTGAGTGT
21	CTTCACCTGCCACCTCCTT	CCCCCGTATGACTACTCAGG
22	CGCTTTGAATGCTCCTTATG	GAGGGAGGAGCTGGTGGT
23	GCCTCCTTTAAGCTCATGCT	GCCTCATTATCTCTCCCCAAA

7. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di oligonucleotidi in grado di amplificare la regione di regolazione del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare la regione di regolazione del gene codificante per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana comprende l'uso delle coppie di oligonucleotidi:

1_Pr	TTCCCCTCACTCCATCTCTG	GACCCCTGCTCTTAGGGATA
2_Pr	GATTCAGGACCACTCCATCC	GGGAACAGTCAGAGGGACAGG

4. 9. Metodo secondo le rivendicazioni precedenti in cui la fase di evidenziazione di almeno un frammento amplificato con eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta o per metodica SSCP (single strand conformation polymorphism¹⁷) DHPLC, o DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis¹⁸).

5. 10. Kit diagnostico per patologie collegate all'emicrania per attuare il metodo secondo le rivendicazioni da 3 a 9 comprendente:

- almeno una coppia di oligonucleotidi per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale o di regolazione genica di detta subunità;
- un DNA di controllo da soggetto non affetto.

11. Kit secondo la rivendicazione 10 in cui le coppie di oligonucleotidi per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare tutta la regione codificante del gene per la subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana.

12. Proteina subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di patologie collegate all'emicrania.

13. Proteina subunità alfa 2 della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana, o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di patologie collegate all'emicrania.

14. Metodo per l'identificazione di un agente agonista o antagonista della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana o di una porzione funzionale o di regolazione genica di essa, comprendente:

- (iv) transfettare una linea cellulare con un gene per una isoforma mutante della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) umana che sia resistente all'ouabaina;
- (v) esporre opportunamente le cellule trasfettate all'agente;

(vi) misurare l'attività della pompa Na K in funzione del trasporto ionico con ioni marcati.

15. Metodo per l'identificazione di un agente agonista o antagonista della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) o di una porzione funzionale comprendente le fasi di:

- (i) trattare con l'agente un animale transgenico che esprima un'isoforma mutante della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) o che sia deleto in parte o completamente del gene codificante la pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) o
- (ii) trattare con l'agente linee cellulari eucariotiche o procariotiche che esprimano forme mutanti o normali della pompa Na K (ATPasi, ATP1A2) mediante transfezioni transienti o stabili oppure in condizioni fisiologiche.

Roma,

p.p. Fondazione Centro San Raffaele Del Monte Tabor
DE SIMONE & PARTNERS SpA (OC)

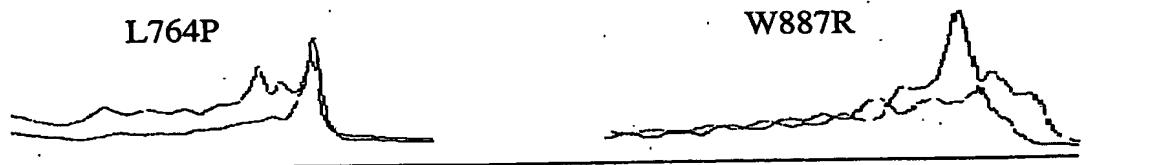
Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

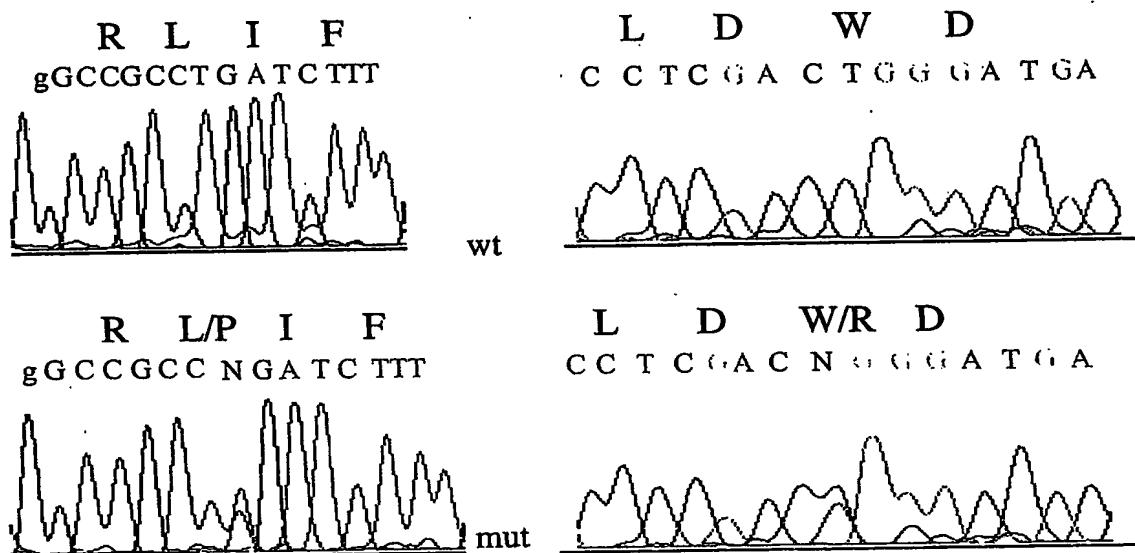


RM 2002 A 000576

a

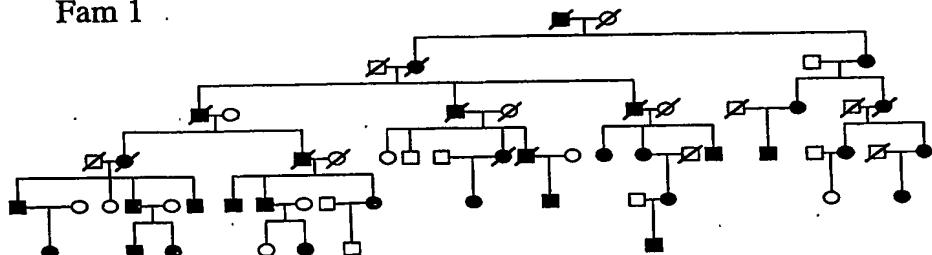


b



c

Fam 1



Fam 2

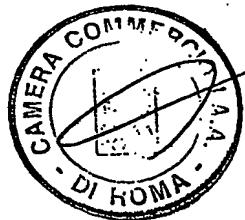
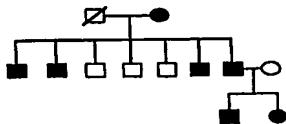


FIGURA 1

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
10 dicembre 2002

RM 2002 A 000576

764P

P50993|ATP1A2_HUMAN
 P05023|ATP1A1_HUMAN
 P13637|ATP1A3_HUMAN
 P06686|ATP1A2_RAT
 P24797|ATP1A2_CHICK
 P18907|ATP1A1_HORSE
 Q64541|ATP1A4_RAT
 Q13733|ATP1A4_HUMAN
 P06687|ATP1A3_RAT
 P24798|ATP1A3_CHICK
 P58312|ATP1A3_OREMO
 P50997|ATP1A1_CANFA
 P05024|ATP1A1_PIG
 P04074|ATP1A1_SHEEP
 P06685|ATP1A1_RAT
 P09572|ATP1A1_CHICK
 P30714|ATP1A1_BUFLA
 Q92123|ATP1A1_XENLA
 Q92030|ATP1A1_ANGAN
 Q9YH26|ATP1A1_OREMO
 P25489|ATP1A1_CATCO
 Q9WV27|ATP1A4_MOUSE
 P28774|ATP1B_ARTSF
 P13607|ATNA_DROME
 P35317|AT1A_HYDAT
 P05025|ATP1A_TORCA
 Q64392|ATHL_CAVPO
 P54707|ATHL_HUMAN
 Q9TV52|ATHL_RABIT
 P54708|ATHL_RAT
 Q92036|ATHL_BUFLA
 Q64436|ATHA_MOUSE
 P09626|ATHA_RAT
 P50996|ATHA_CANFA
 P19156|ATHA_PIG
 P27112|ATHA_RABIT
 P20648|ATHA_HUMAN
 Q92126|ATHA_XENLA

VEEGRLIFDNLK 770
 VEEGRLIFDNLK 773
 VEEGRLIFDNLK 763
 VEEGRLIFDNLK 770
 VEEGRLIFDNLK 767
 VEEGRLIFDNLK 771
 VEEGRLIFDNLK 778
 VEEGRLIFDNLK 250
 VEEGRLIFDNLK 763
 VEEGRLIFDNLK 760
 VEEGRLIFDNLK 760
 VEEGRLIFDNLK 771
 VEEGRLIFDNLK 771
 VEEGRLIFDNLK 771
 VEEGRLIFDNLK 773
 VEEGRLIFDNLK 771
 VEEGRLIFDNLK 773
 VEEGRLIFDNLK 773
 VEEGRLIFDNLK 775
 VEEGRLIFDNLK 772
 VEEGRLIFDNLK 773
 VEEGRLIFDNLK 777
 VEEGRLIFDNLK 782
 VEEGRLIFDNLK 754
 VEEGRLIFDNLK 791
 VEEGRLIFDNLK 781
 VEEGRLIFDNLK 772
 VEEGRLIFDNLK 782
 VEEGRLIFDNLK 791
 VEEGRLIFDNLK 843
 VEEGRLIFDNLK 785
 VEEGRLIFDNLK 791
 VEQGRLIFDNLK 782
 VEQGRLIFDNLK 782
 VEQGRLIFDNLK 783
 VEQGRLIFDNLK 783
 VEQGRLIFDNLK 784
 VEQGRLIFDNLK 784
 VEQGRLIFDNLK 780

887R

RLLGIRREDWEDDR 890
 HLLGLRWDWEDDR 893
 NLVGIRRENWEDDR 883
 RLLGIRREDWEDDR 890
 RLLGIRRLAWEDDR 887
 HLLGLRWDWEDDR 891
 DLLGIREYWDQDT 898
 DLLGIRRHWEOK 370
 NLVGIRRENWEDDR 883
 CLVGIRRSWEDDR 880
 QLVGIRRENWEDDR 880
 HLLGLRWDWEDDR 891
 HLLGLRWNWEDDR 891
 HLLGIRRTMWEOK 891
 HLLGIRETWWEDDR 893
 HLLGIRETWWEDDR 891
 GLVGIRREBOWEDDR 891
 TLLGIRWANEOK 893
 TLLGIRRNWEDDR 895
 TLLGIRRNWEDDR 892
 DLLGIRRHWEOK 893
 RLLGIRRNWEDDR 897
 DLLGIREYWDQDT 902
 DLEGLRKHWESR 874
 KLEGIRKMWESK 911
 YLEGIRLSQWELM 901
 DLIGIREKWEEL 892
 SLIQLPKWEDQ 902
 TLINLRVWEKD 911
 SLFHLRRAWESD 963
 SLINLRVWEETD 905
 TLVGIRREDNEKI 911
 LCVGLRPOWEDH 902
 LCVGLRPOWEDH 902
 LCVGLRPYWNH 903
 LCVGLRPQWNH 903
 LCVGLRPOWEDH 904
 LCVGLRACWEDH 904
 YVLGLRSWENQ 900

FIGURA 2

UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 N° d'iscr. 820 B
 dopo Capasso



UN MANDATARIO
di Olga Capasso
(n° d'iscr. 820 B)

RM 2002 A 000576

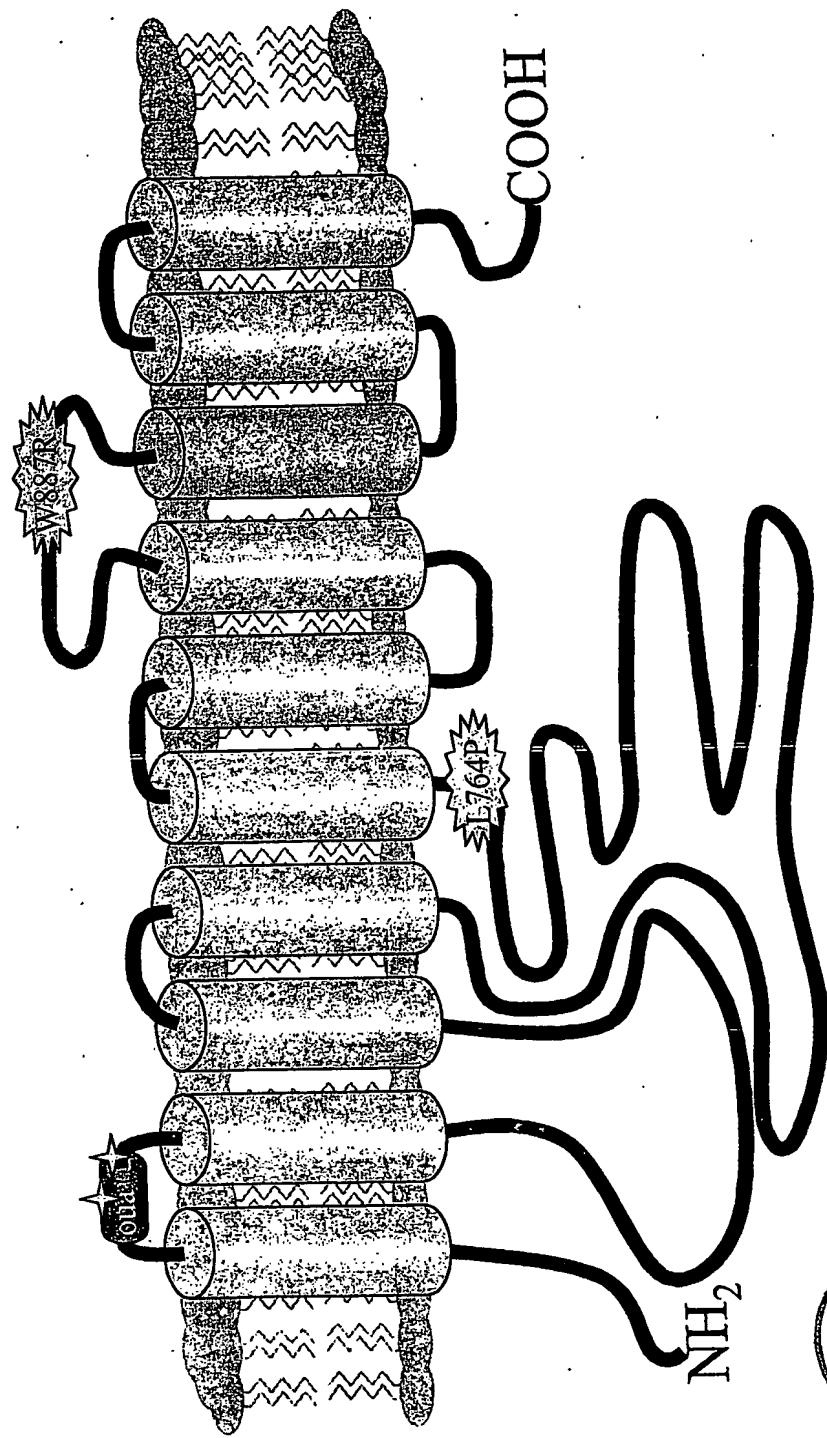


FIGURA 3



RM 2002 000576

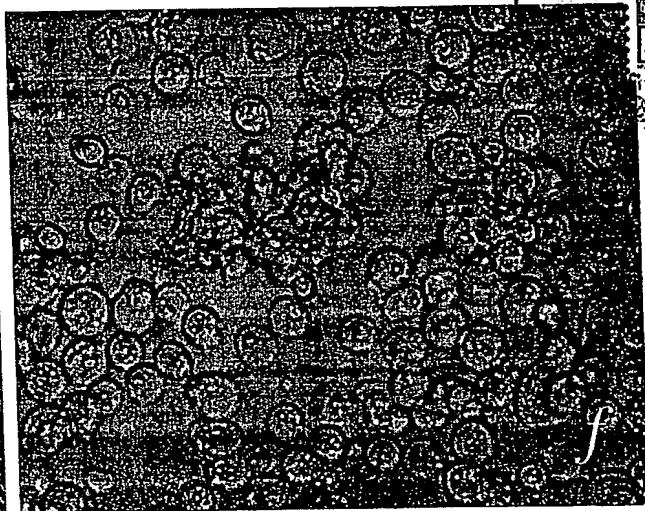
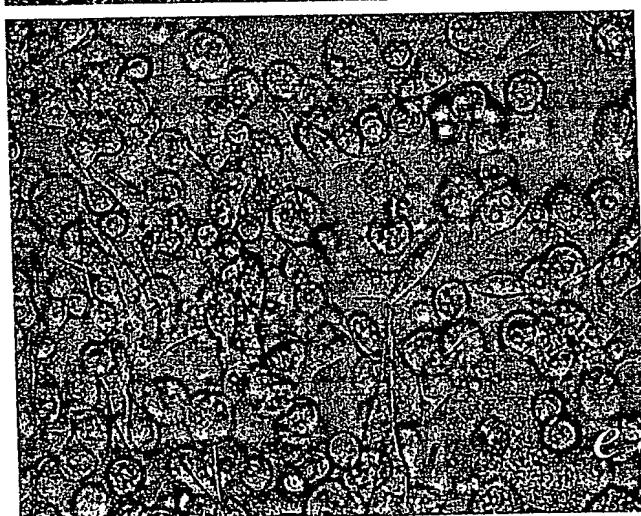
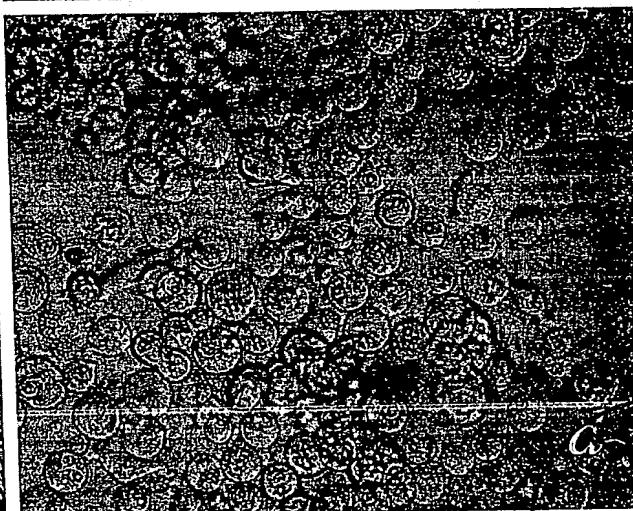
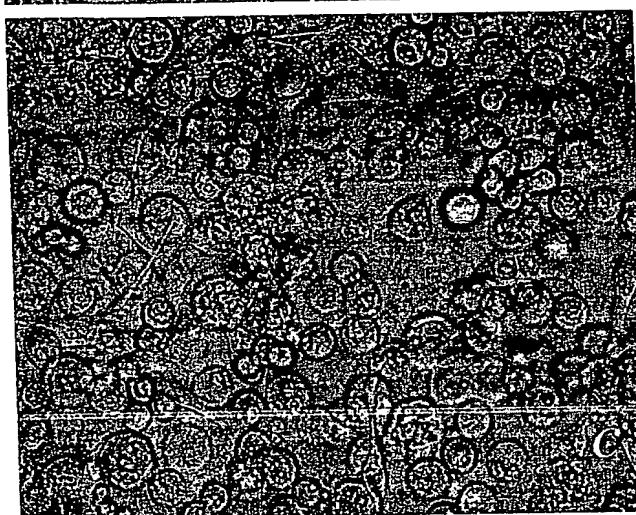
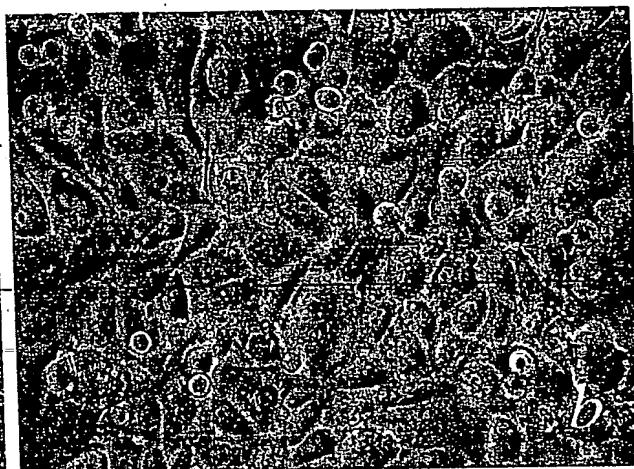
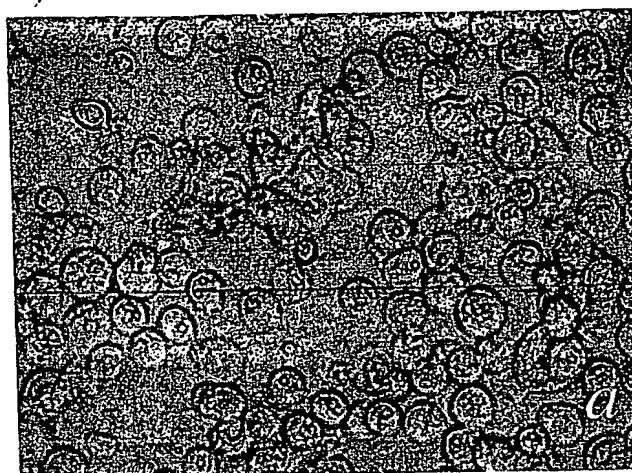


FIGURA 4

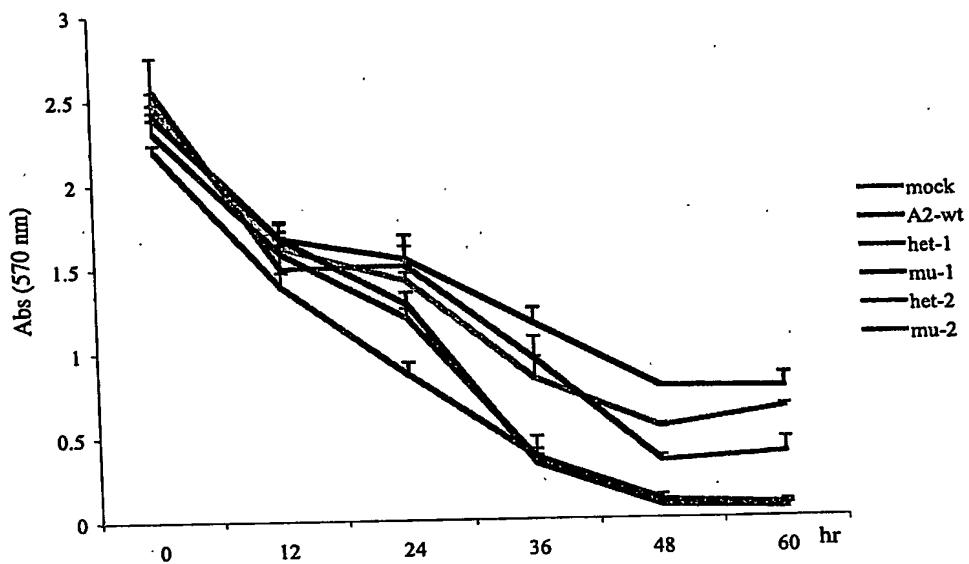


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

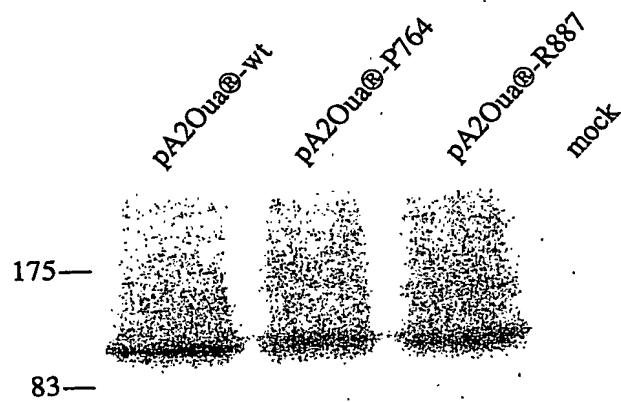
olga capasso

RM.2002 A 000576

a



b



62—

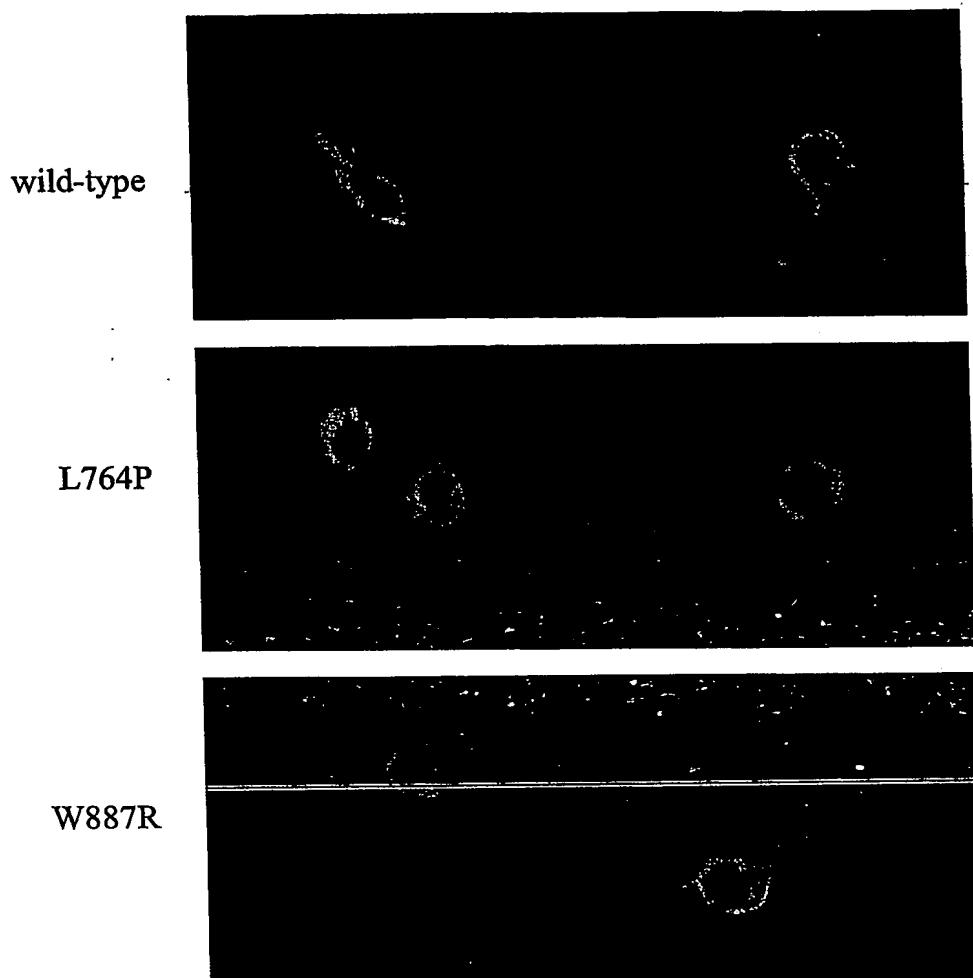
FIGURA 5

UN MANDATARO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso

RM 2002 A 000576

a



b

	mock	wild-type		L764P		W887R		
175 —				—	—	—	—	
83 —		—	—	—	—	—	—	
62 —	s/n	p	s/n	p	s/n	p	s/n	p

FIGURA 6

Olga Capasso
CON MANIFATTORI
per sé e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.